

平成21年度戦略的基盤技術高度化支援事業

なめこ廃菌床とニンニク加工残渣を活用した
防カビ・防虫機能を有するコンポスト化技術の開発

研究開発成果等報告書

平成22年 6月

委託者 東北経済産業局
委託先 農事組合法人田子なめこ農場

目 次

第 1 章	研究開発の概要	1
1-1	研究開発の背景・研究目的及び目標	1
1-2	研究体制（研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者）	4
1-3	成果概要	8
1-4	当該研究開発の連絡窓口	8
第 2 章	本論（研究開発の詳細）〔抜粋〕	9
2-1	発酵処理工程の開発	9
(1)	発酵条件の検討	10
(2)	分解能の評価とコンポスト選抜	11
2-2	肥効性の評価	12
(1)	モデル植物による評価	12
(2)	肥効性の圃場試験	12
2-3	防カビ・防虫活性の評価	14
(1)	抗カビ性モデル評価	14
(2)	抗カビ性の圃場試験	15
2-4	農地からの温室効果ガス N ₂ O の産生量の評価	16
(1)	モデル実験検証	16
(2)	圃場試験データ解析	16
第 3 章	平成 21 年度研究開発のまとめと今後の予定	18
第 4 章	全体総括	19
	【参考文献】	20

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

(1) 研究開発の背景と目的

青森県田子町はニンニクの日本一の産地であるが、なめこの生産についても全国有数の地域となった。財団法人田子にんにく国際交流協会を主体とした事業努力によって、ニンニクを起点として、作物の付加価値の向上を追求し、結果としてニンニクの販売価格を高値で維持するブランド化に成功している。農業生産高は、64億円を超え、耕種と畜産がほぼ同額となっている。耕種では、ニンニクを含む野菜が約8割を占め、畜産で、鶏卵事業が9割占めている。田子なめこ農場では、新たになめこを対象とした商品開発も進め、ニンニク事業と融合した事業展開で成功している。

しかしながら、当該ブランド化の負の遺産として、作物由来の廃棄物や加工場残渣の増加が挙げられ、年間1500トン以上が廃棄されるため、環境負荷の低減化と廃棄物の有効利用が必要である。近年、田子町が主体となり、バイオマスタウン構想が推進され、この取り組みについて農水省に承認されたが（補助対象ではない）、なめこ廃棄物（廃菌床）は焼却対象であり、畜糞を活用した堆肥化処理施設が稼働しはじめている。一般的に、ニンニクやなめこはそれぞれ特徴的な特性を有する有機物であり、それぞれ発酵しにくく、堆肥化自体が難しいが、エネルギーロスの少ない処理方法の模索が求められている。特に、きのこ廃菌床の有効利用技術は、なめこ廃菌床に限らず、全国的に求められている。

(2) 研究開発の目的

通常の堆肥では、高機能性が認められないが、本研究開発では、なめこ廃菌床ならびにニンニク加工残渣由来の機能性を付与したコンポストを製造する。そのために、キチン質分解活性を有する好熱性細菌である *Bacillus* sp. を用いて、自然発酵によって高温となる好気性の発酵槽を活用して、一次発酵を効率的に実施する。さらに、これによって、キチン質に富む廃菌床を分解し、肥料効果の高いキチン質分解産物が豊富なコンポストを製造する。同時に、発酵工程において共存する、抗カビ活性の高い *Bacillus* NP-1 株やニンニク由来の防虫性の忌避物質の付与によって、防カビ・防虫機能を有する、従来にない新しいタイプの高機能性コンポストを開発する。

そのために、本研究では、好気性発酵槽における *Bacillus* sp. の発酵諸条件を詳細に吟味するとともに、選抜されたコンポストの機能性を肥効性、防カビ・防虫性、環境負荷、特に、温室効果ガスである一酸化二窒素 N_2O の産生量に与える影響を検証する。尚、先行特許に対して、これらの原料の組み合わせにより、高機能性のコンポストを製造する技術は存在していない。

(3) 研究開発の概要

本技術開発では、難分解性のなめこ菌床由来のキチン質の分解産物と、ニンニク由来の害虫忌避物質に富むコンポストを製造するための発酵諸条件を確立する。コンポスト中の発酵工程中の菌相が、安定化することを検証するとともに、抗カビ活性を有する細菌種の存在比率が高いレベルで保持するように制御する。

地域でのリサイクルを考え、肥効性ならびに防カビ・防虫効果に有する機能性コンポストとして、田子町ならびに青森県内のニンニクとリンゴ農園に投与可能なコンポストとなることを目標にする。同時に、モデル植物の実験を通じて、植物に与える分子機序の一端を明確化する。温室効果ガスの N_2O の産生制御を司るカビ由来の P450 nor が、本開発コンポストを施用した農地における生成量のデータを集積し、従来のコンポストを用いた場合の農地における N_2O ガスの産生量に関するデータと比較検証する。

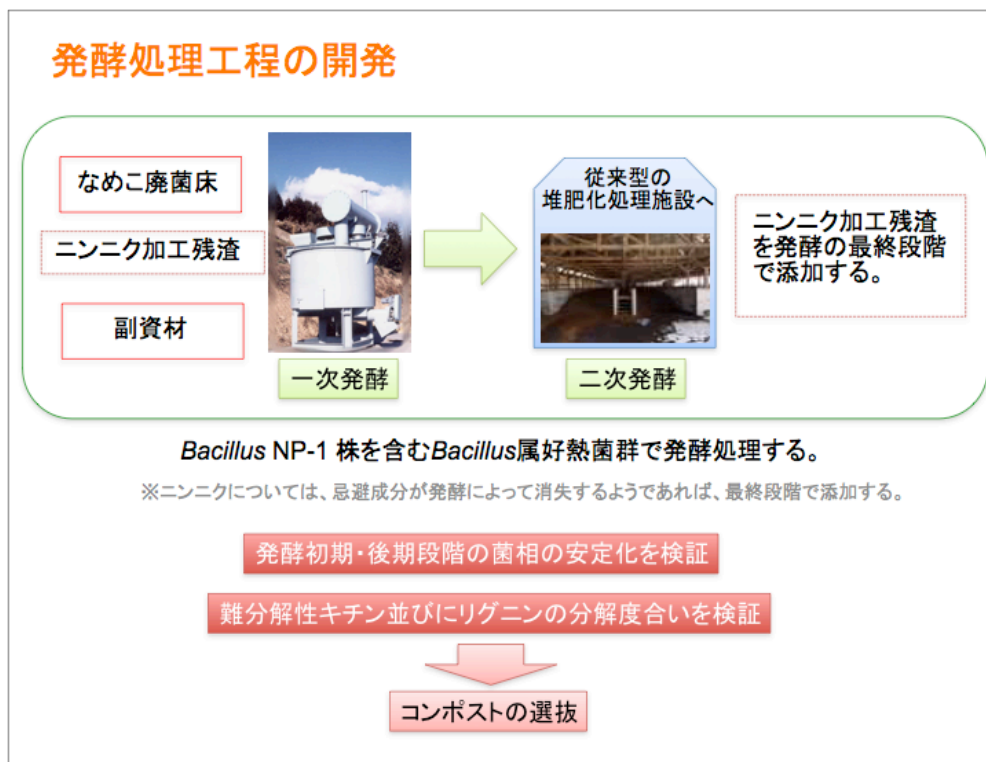


図1 なめこ廃菌床とニンニク加工残渣の堆肥化技術

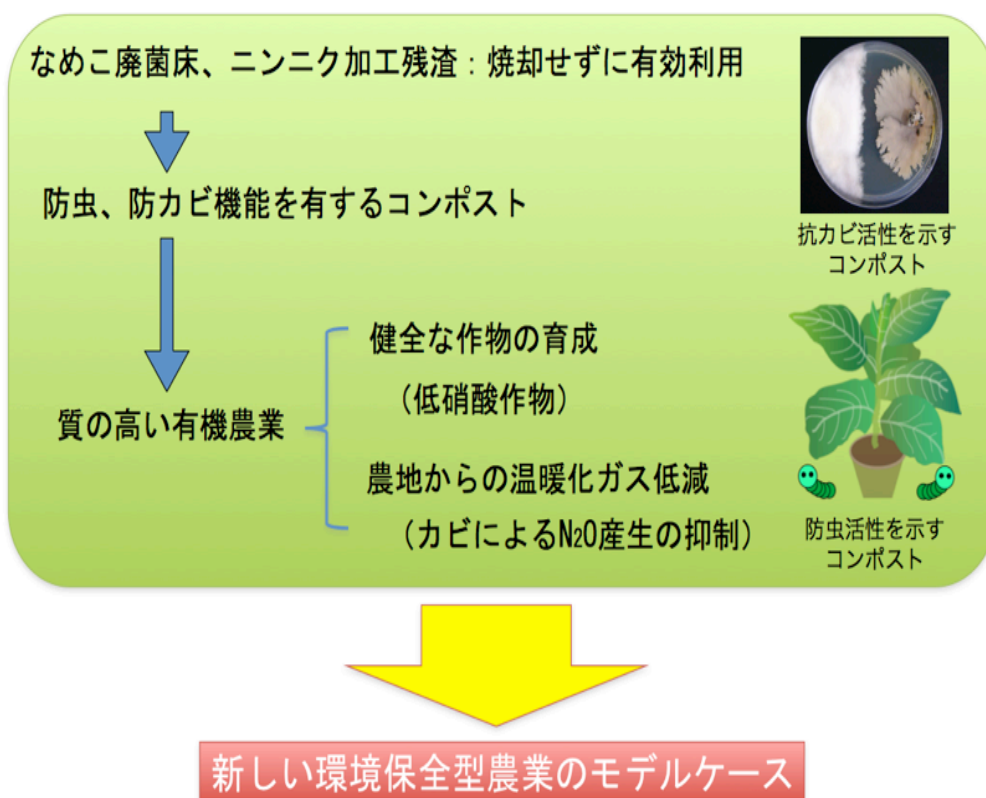


図2 防カビ・防虫機能を有するコンポストを用いた環境保全型有機農業

(3) 実施内容

具体的実施内容を以下に示す。

① 発酵処理工程の開発

①-1：発酵条件の検討

なめこ廃菌床ならびにニンニク残渣を *Bacillus* NP-1 株を含む発酵微生物群を用いて発酵処理する。発酵工程のデータ解析については、各残渣の投入方法、投入量、ならびに発酵時間、発酵温度、発酵微生物相等の最適諸条件を解析する。これらの結果に基づいて、プラントの運転制御諸条件を確立する。

①-2：分解能の評価とコンポスト選抜

CE（キャピラリー電気泳動法）等を用いて化学分析し、生化学的評価の高いコンポストを選抜する。また、同時に微生物相について PCR-DGGE 法等を用いて解析し、菌相と代謝産物の基準を明確化する。

② 肥効性の評価

②-1：モデル植物による評価

サブテーマ①-2で選抜されたコンポストについて、育苗試験を実施し、生育度合いと品質（栄養成分としての代謝産物濃度）に与える影響について、従来堆肥と比較検証する。

②-2：肥効性の圃場試験

圃場試験としては、青森県田子町にて通常栽培されている健全なニンニクのモデル農園の一区画について、施肥試験を実施する。

③ 防カビ・防虫性の評価

③-1：抗カビ性のモデル評価

サブテーマ1で選抜されたコンポストについて、シャーレ試験等を通じて防カビ活性を確認し、サブテーマ2の肥効性のデータと照合し、効果的な施用濃度を検証する。

③-2：抗カビ性の圃場試験

圃場試験としては、青森県田子町にて病気の認められるニンニクのモデル農園について、冬期における施用試験を実施し、成長度合を検証する。

④ 農地からの温室効果ガス N_2O の産生量の評価

④-1：モデル実験検証

栽培試験時の土壌中の糸状菌の菌量を定量評価するとともに、発生する N_2O のガス産生量を測定する方法を確立するとともに、モデルとなるコンポストの影響を解析する。

④-2：圃場試験データ解析

圃場におけるサンプルを用いて、従来コンポスト、化学肥料を用いた農地の性状に関するデータを蓄積する。

⑤ 研究全体の統括、ならびに事業化調査

⑤-1：全体計画の企画・調整・進捗状況の確認

研究スケジュール表を作成するとともに、現場の状況に合わせた企画の調整、並びに進捗状況の確認を実施し、円滑な研究推進を図る。

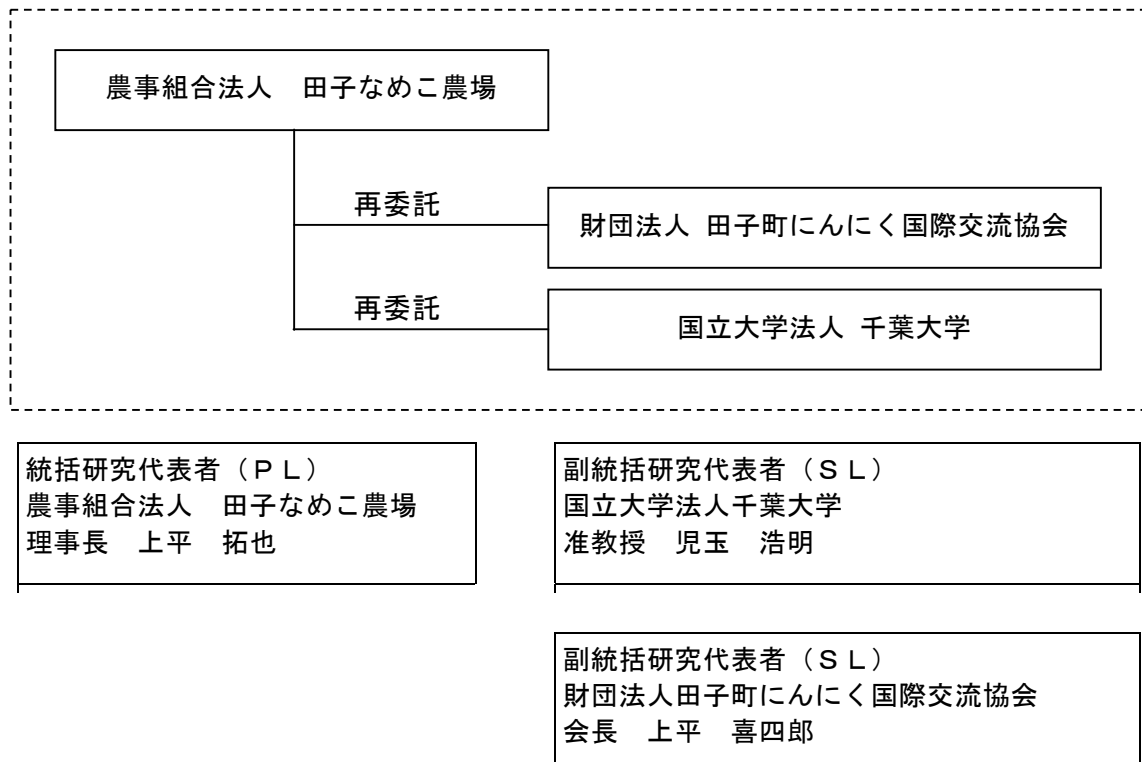
⑤-2：事業化計画と調査

コンポストを製造する上での環境影響並びに原材料の入手方法などに関する知見を調査し、研究期間終了後の事業計画を吟味ならびに精査する。

1－2 研究体制（研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者）

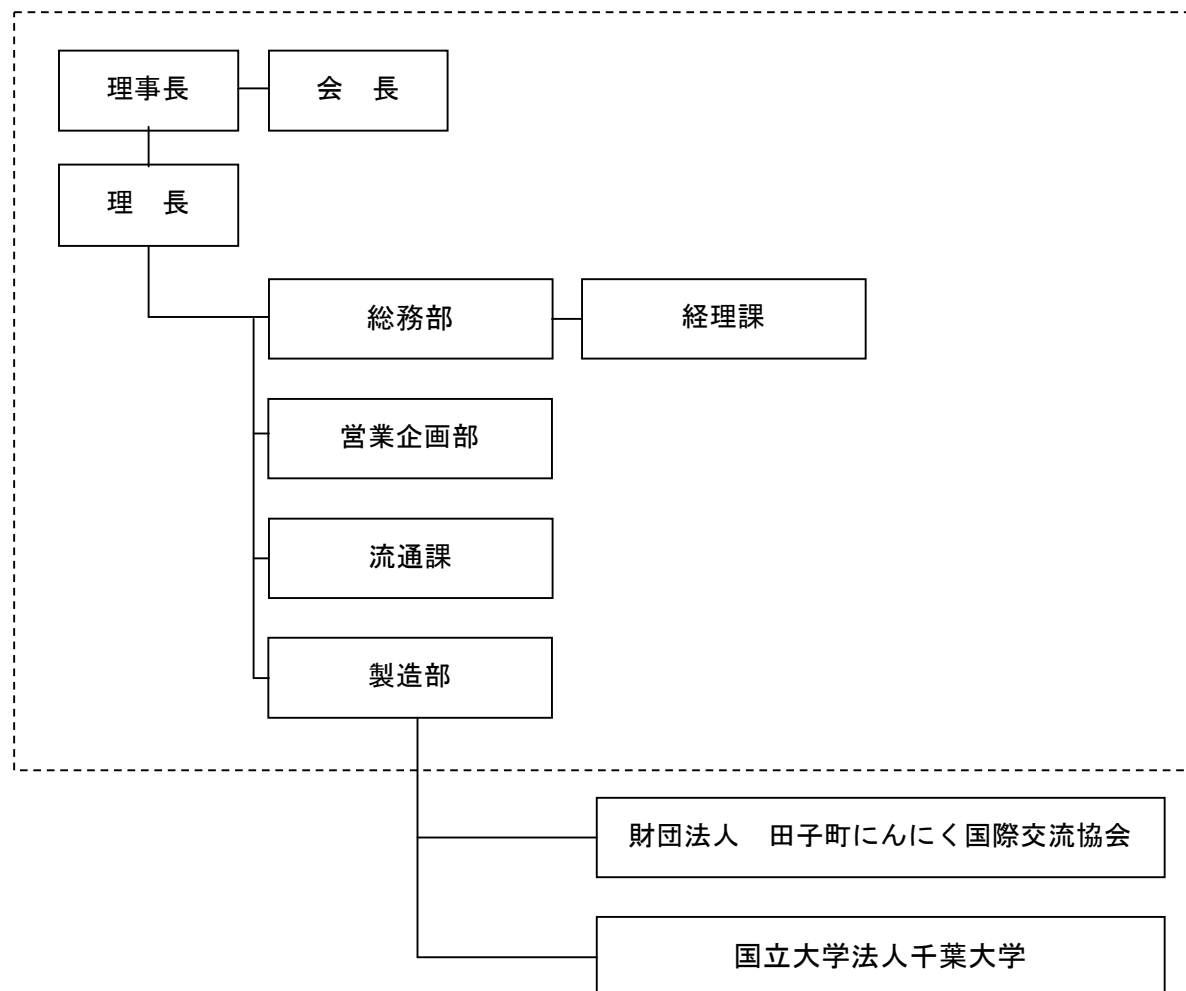
（１）研究組織及び管理体制

１）研究組織（全体）



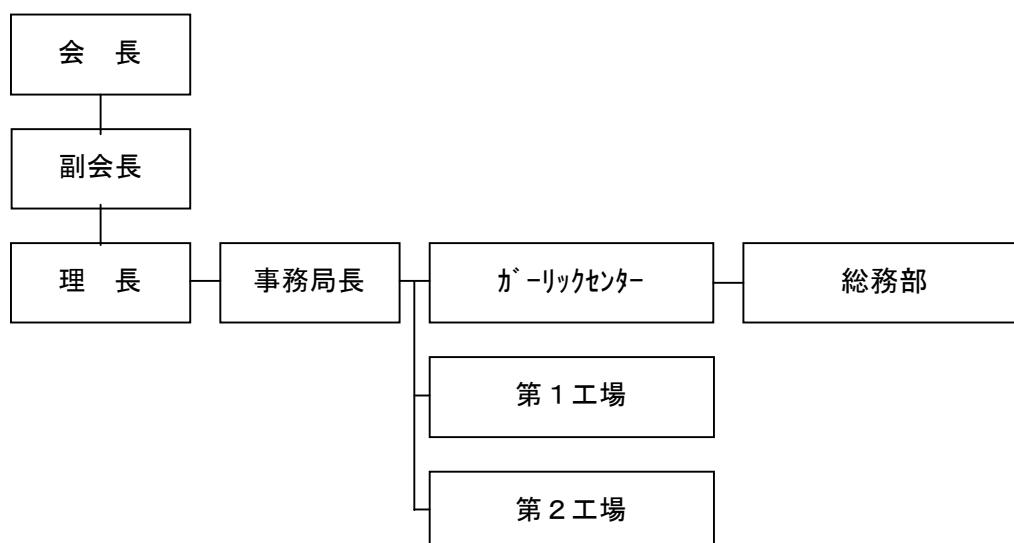
2) 管理体制

① 事業管理者〔農事組合法人田子なめこ農場〕

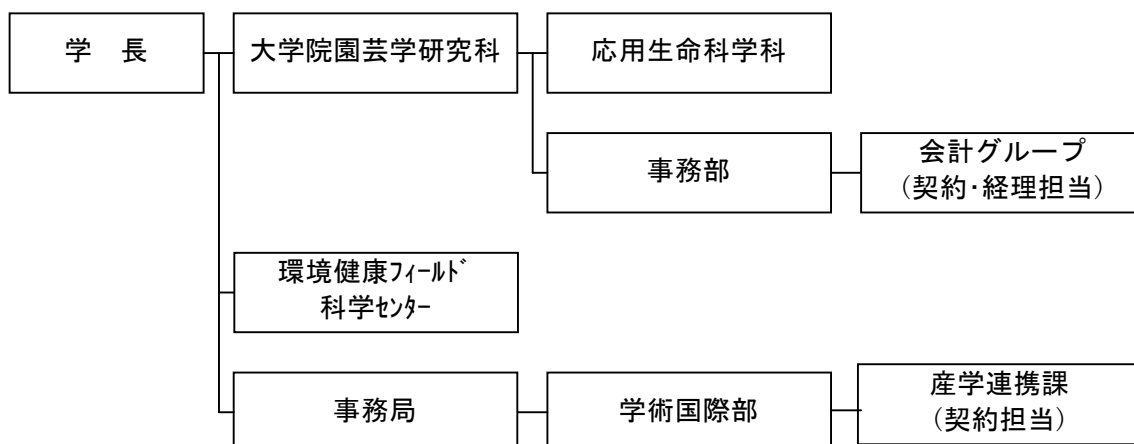


② (再委託先)

〔財団法人 田子町にんにく国際交流協会〕



〔国立大学法人 千葉大学〕



(2) 研究員及びプロジェクト管理員（役職、実施内容別担当：実施内容(番号)は1－1(3)項参照）
 【総括事業代表者（PL）】（プロジェクト管理員）

氏名	所属・役職
上平 拓也	農事組合法人田子なめこ農場 理事長

【事業管理者】 農事組合法人田子なめこ農場

①研究員

氏名	所属・役職	実施内容（番号）
上平拓也（再）	農事組合法人田子なめこ農場 理事長	1, 2, 3, 4, 5
長畝博文	農事組合法人田子なめこ農場 理事	1, 2, 3, 4, 5
田中 治	農事組合法人田子なめこ農場 工場長	1, 2
原 正明	農事組合法人田子なめこ農場 製造部研究員	1, 2
原 幸男	農事組合法人田子なめこ農場 製造部研究員	1, 2
白板 武雄	農事組合法人田子なめこ農場 製造部研究員	2, 3, 4
田畑 一栄	農事組合法人田子なめこ農場 製造部研究員	2, 3, 4
細谷 彰夫	農事組合法人田子なめこ農場 製造部研究員	

②管理員

氏名	所属・役職	実施内容（番号）
長畝 博（再）	農事組合法人田子なめこ農場 理事	1, 4, 5
上平 陽子	農事組合法人田子なめこ農場 経理課管理室長	1, 2, 4, 5
栗谷川柳子	農事組合法人田子なめこ農場 総務部事務員	1, 3, 4, 5

【再委託先（研究員）】

財団法人田子町にんにく国際交流協会

氏名	所属・役職	実施内容（番号）
上平 喜四郎	田子町にんにく国際交流協会 会長	1, 2, 3, 4, 5

千葉大学

氏名	所属・役職	実施内容（番号）
児玉 浩明	千葉大学大学院園芸学研究科・准教授	1, 2, 3, 4, 5
池上 文雄	千葉大学環境健康フィールド科学センター教授	1, 3, 5

(3) 他からの指導・協力者

表1に示す委員、アドバイザーが参加した委員会を適宜開催した。

表1 研究開発推進委員会 委員研究推進会議 委員

氏名	所属・役職	備考
上平 拓也	農事組合法人田子なめこ農場 理事長	P L 委
児玉 浩明	国立大学法人千葉大学大学院園芸学研究科 准教授	S L
池上 文雄	国立大学法人千葉大学環境健康フィールド科学センター教授	
上平喜四郎	財団法人田子町にんにく国際交流協会 会長	S L
源新 信雄	財団法人田子町にんにく国際交流協会 事務局長	
長畝 博文	農事組合法人田子なめこ農場 理事	委
中野 和典	国立大学法人東北大学工学部土木工学科 准教授	アドバイザー

(注) ・研究員(労務費を委託対象にする)には、委と備考欄に記載。

・P L (Project Leader)、S L (Sub Leader)を備考欄に記載。

・アドバイザーは備考欄に記載、オブザーバーは記載しない。

1－3 成果概要

H21年度の研究開発成果の概要を以下に列記する。

1) **発酵処理工程の開発：発酵条件の検討**においては、八戸近郊の水産業者から水産加工場のサケ、タラ、サバの加工残渣を入手するとともに、田子町の地元の豆腐業者から提供されたオカラを発酵副資材として加えて発酵試験を実施したところ、発酵温度が50-60℃で24時間維持し、プラント排出後、2次発酵工程で外気温が零下でも自家発酵熱により60℃以上の温度を維持し(1ヶ月以上)、廃菌床が発酵基質として有効であることが判明した。また、ニンニク加工残渣の投入も発酵を促進する結果が確認された。**分解能の評価とコンポスト選抜**においては、発酵槽内の含水率と配合率を考慮し、最も発酵温度が高くなり、発酵物が黒色化した発酵産物をいくつか選定し、分解効率の高いコンポストを選抜する条件を確立することができた。

2) **肥効性の評価：モデル植物による評価**においては、モデル植物のシロイナズナ(アブラナ科：学名 *Arabidopsis thaliana*) において、成育度合い、並びに品質に与える影響を解析し、特に硝酸濃度の低減効果を有するコンポストをつくることができたことが判明した。**肥効性の圃場試験**においては、ニンニクの栽培現場として、生育状態があまり良くない圃場について栽培試験を実施することができ、やはり硝酸に対する低減効果を確認することができた。

3) **防カビ・防虫活性の評価：防カビ・防虫活性の評価**においては、実験室レベルにおいてフザリウムに対する抗カビ活性の高いバクテリア2菌種を分離することができた。1菌種については、新菌と想定された。**抗カビ性の圃場試験**においては、線虫被害や病気の多いニンニク圃場に関して、施用試験を実施し、評価を実施した。六月時点では今年の冬から春かけて寒かったことも影響して、比較的病気が少ないため、主に生育に与える影響を評価した。その結果、少なくとも従来の栽培方法よりも良好であり、高額な従来肥料と同等かそれ以上の効果があることを確認することができた。

4) **農地からの温室効果ガス N₂O の産生量の評価：モデル実験検証**においては、N₂O インキュベーターを設計し、N₂O ガスを測定することができるようになった。また、予備試験段階では、当該コンポスト用の発酵微生物によって、土壌中の N₂O ガスの産生量が減少する傾向があることが明らかになった。**圃場試験データ解析**においては、土壌状態自体にバラツキがあり、条件検討をするのみで採取サンプル自体で試験を実施するまでには至らなかった。

5) **研究全体の統括、並びに事業化調査：全体計画の企画・調整・進捗状況の確認**においては、総括責任者ならびに副総括責任者との話し合いの上で、各実験スケジュールを統括管理するとともに、計4回の委員会を実施し、進捗状況を確認しながら、円滑に調整しながら運用することができた。**事業化計画と調査**においては、地元の産業廃棄物を扱う上で、環境汚染を含めた地元の状況を調査するとともに、運用方法の理想的な方針について考察することができた。また、主にニンニクの圃場に関して販売する上での事業化計画を立案することができた。

1－4 当該研究開発の連絡窓口

(1) 研究者

- ・所 属：農事組合法人田子なめこ農場
- ・役職・氏名：理事長 上平 拓也
- ・連絡先：TEL 0179-33-1012、FAX 0179-33-1134、E-mail hatuyuki@crocus.ocn.ne.jp

(2) 事業管理者

- ・所 属：農事組合法人田子なめこ農場
- ・役職・氏名：室長 上平 陽子
- ・連絡先：TEL 0179-33-1012、FAX 0179-33-1134、E-mail hatuyuki@crocus.ocn.ne.jp

第2章 本論（研究開発の詳細）〔抜粋〕

2-1 発酵処理工程の開発（サブテーマ番号①）

――【担当：（農）田子なめこ農場、（財）田子町にんにく国際交流協会、千葉大学】

〔目 的〕

なめこ廃菌床とニンニク加工残渣を原材料として、コンポストとして生化学的性状が良好な発酵工程を検討する。主に、抗かび活性を有する *Bacillus* sp. を含む好熱性の発酵菌群を用いて、なめこ菌床及びニンニク加工残渣を主材料とした高温発酵処理の諸条件を確立し、高品質なコンポストを選抜する。

(1) 発酵条件の検討（①-1）

――【担当：（農）田子なめこ農場、（財）田子町にんにく国際交流協会、千葉大学】

(1) ー (i) 測定機器の調整と投入原材料の選定

農事組合法人田子なめこ農場（青森県三戸郡田子町）に密閉式発酵設備とデータ送信システム（図3）、並びに遠隔データ受信システム（図4）を導入するとともに、マニュアルでの計測などを併用して、発酵諸条件の検討を実施した。また、同時に、原材料の円滑な投入を可能とする予備発酵システムを構築した。

原材料としては、表2に示したように、なめこ廃菌床と副資材のタンパク源としてサケの加工残渣とともに発酵させ、発酵諸条件の検討を実施した。次に、八戸の水産加工場の冷凍加工残渣を用いた。さらに、地元の豆腐生産者のオカラを副資材として活用し、発酵状態を確認し、その後、ニンニクの加工残渣を混合投入した。プラントによる発酵時間は24時間を目安として実施した。

発酵工程については、各残渣の投入量、並びに発酵時間等の最適諸条件を千葉大学の管理の下で、日環科学の技術コンサルティングの指導の上で、田子なめこ農場が中心となって作業を進め、ニンニク残渣の調達は田子町にんにく国際交流協会が協力した上で検討した。

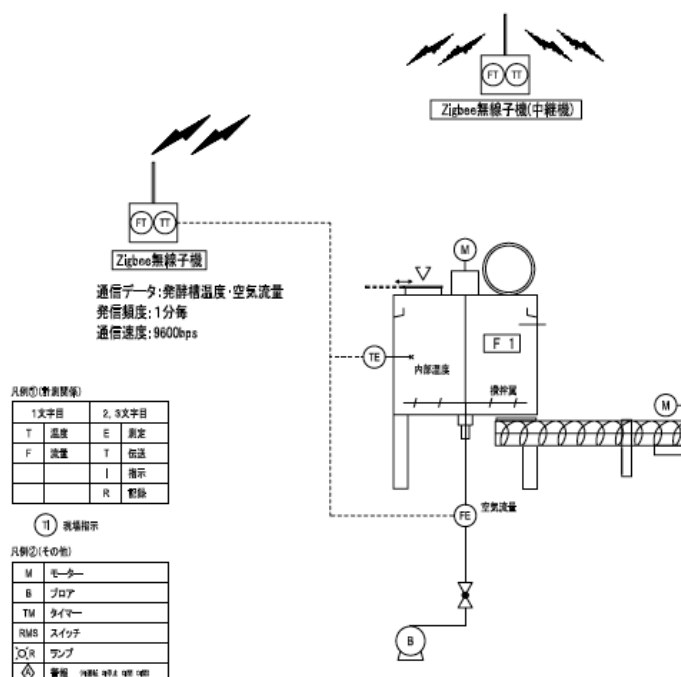


図3 密閉式発酵槽とデータ送信システム

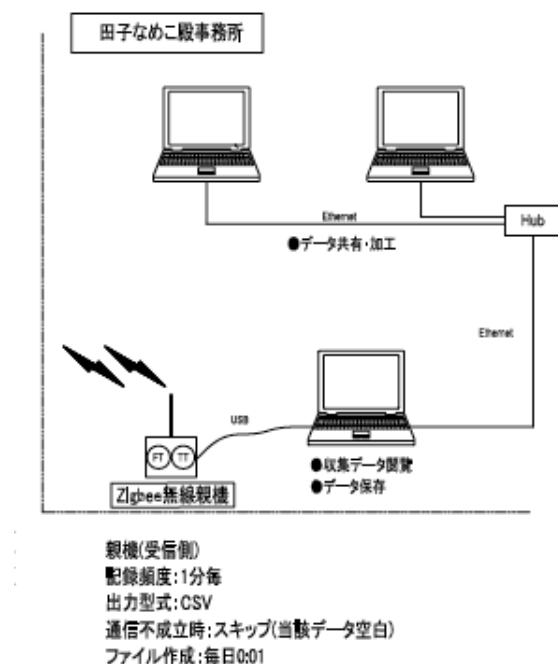


図 4 遠隔データ受信システム

さらに、本研究開発において使用した発酵原材料は、表 2 のとおりである。これらの原料の入手経路、入手可能な数量などについて試算した上で、発酵試験を進めた。これらの発酵物の配合率を最終的に、1m³当り 0.3m³程度の戻し発酵物を投入する条件下で、20kg の魚、あるいは 50kg のオカラを投入することによって、発酵が促進された。また、発酵槽内の適度な水分量が発酵促進に影響を与えるため、発酵時の蒸留液を循環させる配管作業を進め、良好な発酵となった。また、投入方法を工夫し、なめこの菌床の攪拌装置の中古品を用いて、予備発酵させていからプラントに投入できるように工夫をした。

表 2 発酵原料一覧

No.	原材料名	排出現場	概観写真
1	なめこ廃菌床	(農)田子なめこ農場 (青森県三戸郡田子町)	
2	しいたけ廃菌床	(農)田子なめこ農場 (青森県三戸郡田子町)	

3	ニンニク加工残渣	(財) 田子町にんにく 国際交流協会 (青森県三戸郡田子町)	
4	サケ加工残渣など 水産加工残渣	漁業会社A (青森県内)	
5	豆腐残渣 (オカラ)	豆腐店B (青森県内)	

(1) ー (ii) 発酵工程の温度変化の解析

表3、並びに図7に示しているように、外気温、予備発酵温度に関わらず、プラント内の発酵温度を50℃以上に維持することができた。

一方、乾燥状態になったときには、発酵が進まないため、先に導入した蒸留液を循環して発酵槽内に投入することによって克服することができた。尚、二次発酵産物については、70℃前後に到達するようになった。

表3 発酵過程における原材料の種類とプラント内外の温度変化の比較 (手動測定)

No	主原料	副原料	外気温	予備発酵温度	発酵槽内温度 [1次発酵]	プラント排出後 [2次発酵]	備考
1	廃菌床	魚	0.8±3.1	34.7±3.3	52.5±3.8	69.1±0.4	
2	廃菌床	オカラ	9.3±2.9	43.4±5.1	54.9±2.2	70.1±0.5	
3	廃菌床	オカラ	8.9±2.9	43.1±7.1	47.0±2.0	67.3±0.3	乾燥

以下、コンポスト原料を【廃菌床+魚】とした場合のプラントからの排出後の二次発酵過程での温度変化を示している。

図7のように、初期段階については、長期間にわたって60℃以上の発酵温度が持続することがわかる。一方、図8にあるように、二次発酵過程の後期段階での温度変化を確認すると、二次発酵開始後、七週目くらいまでは60℃前後の発酵温度を維持するが、その後、急速に発酵温度が低下し、バクテリアの発酵の基質がなくなったことを示している。

(2) 分解能の評価とコンポスト選抜 (①-2)

【担当：千葉大学】

プラント排出直後のコンポストのサンプルとその発酵産物を野積みして時間経過したものをサンプリングし、DGGE解析などを用いて経時変化を確認し、最適なコンポストを選抜した。

2-2 肥効性の評価（サブテーマ番号①）

―― 【担当：（農）田子なめこ農場、（財）田子町にんにく国際交流協会、千葉大学】

〔目 的〕

サブテーマ①で選抜されたコンポストを対象として育苗試験を実施し、生育度合いと品質（特に硝酸濃度）に与える影響について、従来品と比較検証する。同時に、モデル植物の実験を通じて、植物に与える分子機序の一端を明確化する。

（１）モデル植物による評価（②-１）

----- 【担当：千葉大学】

(1)-(i) 原材料とコンポストが植物の硝酸含量に与える影響について

発酵の原材料に関して、作物の品質に与える影響について解析するとともに、従来型のたい肥製造方式で生産された廃菌床たい肥による影響を解析した。なめこ廃菌床と野積み堆肥とそれぞれ 1.5% を含ませた土で、モデル植物のシロイナズナ／アラビドプシス（アブラナ科： *Arabidopsis thaliana*）を栽培し、播種後 18 日目の植物の新鮮重量、硝酸含量についてイオンクロマトグラフィーを用いて測定した。その結果、廃菌床と野積み堆肥には硝酸含量を低減させる活性はないことが確認された。

次に、コンポストについて、植物硝酸含量に与える影響について調べた。

24 時間の高温発酵をおこなって得られた産物を土に混合し、アラビドプシスを栽培した。播種後、18 日目のアラビドプシスの葉の硝酸含量を測定したところ、葉の硝酸含量が大きく低下しており、なめこ廃菌床を原材料として好熱性 *Bacillus* sp. によるコンポスト化を行っても、モデル種菌を含む好熱菌コンポストと同様、植物の硝酸含量を低減させる効果が付与させることが可能であることが明らかになった（図 15）。

図 15 アラビドプシスの硝酸含量

(1)ー(iv) オカラ＋廃菌床コンポストがアラビドプシスの硝酸含量に与える影響

アラビドプシスの硝酸含量に与える影響については一次発酵終了産物を乾燥させたものを使って試験した。この際、生体重量に与える阻害効果はほとんど認められず、その一方で、おから・廃菌床コンポストを与えると、アラビドプシスの硝酸は低下する傾向を示した。

（２）肥効性の圃場試験（②-２）

----- 【担当：（農）田子なめこ農場、（財）田子町にんにく国際交流協会、千葉大学】

(2)ー(ii) コマツナを用いた成育試験【魚＋廃菌床コンポストの評価】

魚＋廃菌床コンポストとオカラを用いて、ニンニク圃場における試験を実施した。当該圃場は比較的生育の悪い土壌条件であることがあらかじめ判明している現場であった。

二次発酵（20 日程度）のコンポストを用いて、ニンニクに施肥し（2 月 24 日）、春先に成長途

中のニンニクを採取した

表 5 に示しているように、コンポスト投与区において、葉数が 15%程度多い傾向が認められた。葉数は、ニンニクを包んでいる葉の厚みを示しているため、より障害に強くなっていることが推察された。

一方、茎の厚みはニンニクの大きさとはほぼ比例する傾向があったが、本試験結果ではあまり違いが認められなかった。モデル植物を用いた実験室レベルの試験とは当該傾向については違いが認められた。

表 5 ニンニク圃場における施用試験〔成長に与える影響評価〕

項目	葉数	茎厚 [cm]	重量 [g]
対照区	7.6 ± 0.9	1.3 ± 0.1	54.2 ± 8.5
コンポスト投与区 [100g/m ²]	9.0 ± 1.4	1.3 ± 0.2	55.5 ± 16.8
コンポスト投与区 [500g/m ²]	8.3 ± 1.3	1.2 ± 0.0	49.8 ± 8.8

(2) ー (iii) 魚＋廃菌床コンポストがニンニクの硝酸含量に与える影響

前述の魚＋廃菌床コンポストを用いたニンニク圃場のニンニクを対象として、対照区、コンポスト投与区（100g/m²）、コンポスト投与区（500g/m²）葉と地下の鱗茎の硝酸含量を測定した。

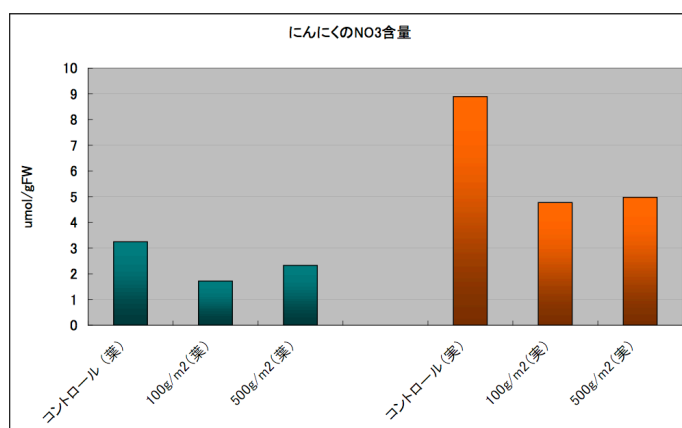


図 23 ニンニクの硝酸含量

その結果、図 23 に示しているように、葉、鱗茎ともにコンポストの投与によって低硝酸となる傾向を示しており、特に鱗茎での硝酸が低下する傾向が認められた。また、投与量としては、1 平方メートル当り 100 g 投与した場合に、500 g と同等の効果が認められることも明らかになった。

2-3 防カビ・防虫活性の評価（サブテーマ番号③）

――【担当：（農）田子なめこ農場、（財）田子町にんにく国際交流協会、千葉大学】

〔目 的〕

サブテーマ1で選抜されたコンポストの防カビ効果について、シャーレ試験にて検証する。千葉大学で保有するフザリウム属菌種に対する抗菌効果をシャーレ試験にて実施し、さらに、サブテーマ2の肥効性のデータと照合し、効果的な施用方法を考案する。

圃場試験としては、病気の多い圃場においてコンポストの投与試験実施し、防カビ・防虫性について解析する。

(1) 抗カビ性のモデル評価（③-1）

-----【担当：千葉大学】

(1)ー(iv) 抗カビ性を示すバクテリアの単離

図27、図28で確認された抗カビ性を示すバクテリアを単離することとした。その結果、2種類のバクテリアを単離し、抗カビ試験を行った（図29）。

図29 抗カビ性を示す単離バクテリア

2

1

この2種類のバクテリアについて菌の同定を行うために、16S rDNAの全長配列（約1500bp）を決定したので、その結果を以下に示す。

表6 コンポストから単離された抗カビバクテリアの16SrDNAの全長配列と類似菌種

単離菌	配列長（bp）	近似するバクテリア	類似性
1（単離菌2）	1473	<i>B. methanolicus</i>	90%
2（単離菌3）	1472	<i>B. subtilis</i>	99%

単離菌1については、配列の検索の結果、最も近縁の種類のバチルス属細菌と比較しても相同性が90%程度と低いため、未同定の菌と想定された。単離菌2については枯草菌に近縁のバチルス属細菌と思われる。今後、実験で求めた配列の信頼性を再検証し、確定する予定である。

当該抗カビバクテリアを増量する条件を確立し、コンポストの抗カビ活性を高めることによって、本開発コンポストの機能性が向上することが想定された。

(2) 抗カビ性の圃場試験 (③－2)

----- 【担当：(農) 田子なめこ農場、(財) 田子町にんにく国際交流協会、千葉大学】

(1) ー (i) 圃場試験と病気の発生率に与える影響評価

図 30 左写真に示したニンニク圃場は、線虫被害の多発している圃場であり、農薬が効かない状態であった。そこで、通常栽培区とコンポスト投与区、並びに病気の発生を抑えと考えられているニーム肥料投与区を対象として、病気の発生度合いを確認した。

尚、当該圃場は病気が多いため、想定される使用量の 10 倍以上のコンポストを投与した。

その結果、図に示したようにまだ収穫前であるにも関わらず、病気の被害が確認され、図 30 右写真に示したように、病気の発生が確認された。写真の右から 1 番目と 3 番目のニンニクは、根の付け根に腐ったような後があり、線虫の被害を受けたと想定される現象が見受けられた。



図 30 ニンニク圃場と線虫による感染・非感染のニンニク

次に、これらの圃場から収穫されたニンニクについて、生育と病気の発生率に与える影響を解析した。表 7 に示しているように、ニンニクの実を保護する葉の数は差異がないが、ニーム投与区では、葉数が増加する傾向が認められた。ただし、前述の肥効性評価試験を実施したコンポスト投与区と同等であった。

また、重量を推察する茎厚は、3 群で同等であったが、実際の重量は、コンポスト過剰投与区が最低であった。ただし、病気の判定は、ニーム投与区と同様、対照区よりも約 40 % 程度減少する傾向が認められた。本試験では、ニンニクの成長にとって、最適なコンポスト投与量ではなかったため、成長に与える影響は良好な結果が得られなかったが、高価なニーム肥料と同等の病気抑制効果は確認された。線虫はカビの発生度合いに依存して増えることが知られており、コンポストによる抗カビ活性が線虫の減少につながっている可能性が想定された。

2-4 農地からの温室効果ガス N₂O の産生量の評価（サブテーマ番号④）

----- 【担当：（農）田子なめこ農場、千葉大学】

〔目 的〕

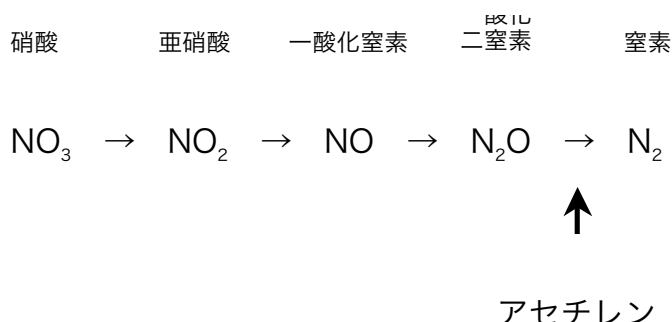
土壌から発生する温室効果ガスの N₂O の産生制御は、バクテリアとカビの存在比率に依存することと想定される。そこで、コンポストを施用土壌から賛成する N₂O ガスの産生と微生物との関係に関するデータを蓄積する。尚、自然界において N₂O は、カビ由来の P450nor による特有の脱窒反応によって生ずることが知られており、炭酸ガスの約三百倍の温室効果をもつことが知られている。22 年度の研究では、サブテーマ 1 で選抜されたコンポストについて、発生する N₂O のガス産生量を測定するシステムを構築する。また、栽培試験時の土壌中の細菌、糸状菌の菌数を解析することによって、P450nor の発現量を推測する。

(1) モデル実験検証（④-1）

----- 【担当：千葉大学】

(1)-(i) N₂O ガス測定方法の確立

好熱菌発酵産物の投与が地球温暖化ガスの発生に与える影響について評価するために、まず実験手法の確立をおこなった。微生物による脱窒経路は以下のとおりである。



N₂O は地球温暖化能が強いガスであり、無機肥料の投与によって畑から放出されるガスでもある。そこで、コンポスト投与による N₂O 発生への影響をアセチレンブロック法により評価するシステムを構築することができた。

(2) 圃場試験データ解析（④-2）

----- 【担当：（農）田子なめこ農場、千葉大学】

(2)-(i) コンポスト投与ニンニクほ場におけるバクテリア総量の測定

2月にニンニクほ場に500g/m²の割合で、魚＋廃菌床コンポストを投与し、5月末にサンプリングを行った。ISOILキットを用いて一定量の土壌から直接DNAを抽出し、バクテリア総量をリアルタイムPCRにより定量した。

コンポストを投与していない対照区のバクテリア量の平均を 100 とし、各サンプリング地点のバクテリア量を図 36 に示した。

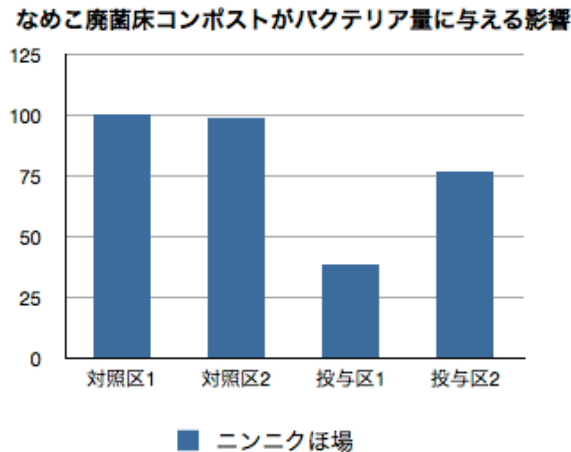


図36 圃場におけるバクテリア総量の比較

その結果、コンポスト投与区で、バクテリア量が減少する傾向が確認された。しかしながら、当該結果は、カビを減らす当該コンポストの効能を考えると、バクテリア以外の放線菌、あるいは今回用いたユニバーサルプライマーで増幅できないバクテリアが増加している可能性が想定された。本試験期間中では、詳細な解析データを得ることができなかった。

今後、DNAの抽出方法や精製方法、並びにユニバーサルプライマーの種類を変えること等によって、より詳しい菌相変化の定量化が可能になると考えている。

(2)-(ii) コンポスト投与ニンニクほ場におけるN2Oガスの測定

ニンニク圃場から採取した土壌サンプルを用いて、N2O測定を実施する予定であったが、ロット間のバラツキなどについて、結論を出すことができなかったため、本研究期間中には測定することができなかった。

第3章 平成21年度研究開発のまとめと今後の予定

(1) 平成21年度研究開発のまとめ

今年度の成果を以下に列記する。

青森県田子町は、なめこ並びにニンニクの全国有数の産地である。なめこ廃菌床やニンニク加工残渣については、焼却対象であり、エネルギーロスの少ない処理方法が求められている。本研究では、これらの産地加工残渣を活用し、防虫・抗カビ機能を併せ持つ新規コンポストの製造技術を開発することを目標とした。

従来のコンポスト化技術では発酵過程の制御が難しく、菌相が安定しない。加えて機能性を付与したコンポストの開発も少ない。そのために、抗カビ機能を発揮する新規の *Bacillus* sp. を含む好気性細菌群を活用した発酵処理装置を開発することによって、キチン質に富む廃菌床を高温下で効率的に分解し、さらにニンニクに含有する防虫成分を付与したコンポストを製造し、その機能性を検証した。（得られたコンポストは地産地消により、ニンニクやリンゴのブランド価値を高める。）

今回開発した技術の特色は、以下の通りである。

- ・ 抗カビ発酵菌群を含むコンポストの製造：抗カビ性細菌を含む好熱性 *Bacillus* 属菌群を用いた一次発酵工程の諸条件を確立し、なめこ廃菌床を用いて抗カビ活性を保持したコンポストを製造することができた。
- ・ 硝酸態低減能を有するコンポストの製造：魚ならびにオカラを副資材とすることによって、作物中の硝酸態窒素濃度を減少させることが可能なコンポストを製造することができた。
- ・ N₂O ガスの低減化確認システムの構築とコンポストによる N₂O ガス低減機能：土壌からの N₂O の測定を可能とするインキュベーターシステムを構築し、当該システムで N₂O の測定が確実にできるようになった。また、当該システムを用いて、今回製造可能となったなめこ廃菌床を用いたコンポストの N₂O ガス産生能を確認することができた。同時に、バクテリアやカビの存在比率との関係についても、検証できるシステムを確立することができた。

(2) 今後の予定

今年度の研究成果を反映し、今後、次のような研究開発を継続する予定である。

本試験からなめこ廃菌床を材料として好熱菌発酵を行い、抗カビ活性、植物の硝酸含量を低減させる活性を併せ持つコンポストを製造することが可能であることが明らかになった。一方で、野積みすると抗カビ活性が低下することも明らかになり、逆にコンポスト中から抗カビ活性の高いバクテリアの単離にも成功した。カビは線虫の餌とも考えられており、さらにカビの土壌における存在がカビ性の病気の原因であるとともに、温暖化係数の高い N₂O の発生源でもある。したがって、当該コンポストによって、カビの制御ができるのであれば、環境保全型の有機農業を円滑に進めるために非常に有効である。

今後、このような機能性を高めることができる諸条件を詳細に検討し、高付加価値の有機農業の推進に役立てる。実際、ニンニクの硝酸含量を低下させる働きを示したことは、ニンニクの食味にも変化している可能性が生じてきており、ニンニクを主体として作物の味への影響について、さらに詳しく検討する必要があると思われる。

これによって、青森県を中心としたニンニクやリンゴの生産に貢献し、新しいブランド化に利用できるように開発を進めていく。

第4章 全体総括

持続的に発展可能な社会「バイオマス・ニッポン」の実現に向け、バイオマス・ニッポン総合戦略推進会議（内閣府、総務省、文部科学省、農林水産省、経済産業省、国土交通省、環境省）では、地域のバイオマスの総合的かつ効率的な利活用を図るバイオマスタウン構想を、全国の市町村から募集している。田子町は、地元の有力企業である農事法人田子なめこ農場、ならびに財団法人田子町ニンニク国際交流協会・田子ガーリックセンターとバイオマスタウン構想について、採用されている（農水省 HP 参照：<http://www.maff.go.jp/j/press/kanbo/bio/090331.html>）。

当該構想では、年間約1200t（炭素換算218t）が排出されている、なめこ廃菌床について、現在、焼却処分されている分を100%農地還元ならびに販売することを目標として掲げている（<http://www.biomass-hq.jp/biomasstown/biomasstown433.html>）。しかしながら、その利用を促進するためには、コンポストとしての機能性を高める必要があった。

本研究開発によって、焼却や炭化などを行うことなく、なめこ廃菌床が有効利用できるのみならず、ニンニクの農場や加工残渣を有効利用できる意義は大きい。さらに、当該システムによって、従来の堆肥施設に新しい機能性を付与したコンポストを製造させることが可能となり、高品質のコンポストの普及を促す事が可能である。現代農業では、カビ性の病原菌や害虫に対する対策が叫ばれているが、天然の作物の忌避性を有効利用する事によって、安全・安心な食づくりが可能となることが期待される。これによって、農業に頼らない有機農業の実現に寄与することを目指す。先ずは、ニンニクやリンゴなどの全国的な特産品を有する農業県である青森県において、大きな役割を果たす事を目指す。環境問題に目を向けても、嫌気性になりやすい一般的な堆肥化施設では、CO₂の温暖化係数の20倍を超えるメタンガスの発生を促すが、本研究のように好気性発酵によるコンポスト化では、その心配がない。また、農業分野から捉えると、学術雑誌「ネイチャー」において、化学肥料に比べて有機系堆肥の方が、地球上のCO₂温暖化対策にも貢献しうることが示唆されている（*Nature* vol. 396, p. 211, 1998）。本開発のコンポストは、有機肥料でありながら、安全な生物農薬としての効果をも兼ね備えた多機能資材であり、その先を見越した資材と考えられる。特に、前述のように、カビは有機窒素源ならびに化学肥料成分を温室効果ガスである一酸化二窒素（N₂O）に変換する唯一の酵素（P450nor）をもつ生物である（Shoun H et al. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 11078-11082）。一酸化二窒素（N₂O）は、自然界における脱窒反応の一つであり（Zumft WG (1997) *Mol. Biol. Rev.* **61**, 533-616）、炭酸ガスの約三百倍の温室効果をもつことが知られている（Laughlin RJ et al. (2002) *Soil. Sci. Soc. Am. J.* **66**, 1540-1548）。したがって、コンポスト中にカビを増やさない成分が含まれていれば、農地における一酸化二窒素（N₂O）の産生を減らすことが予想されるため、本研究開発は単に農業の脱農薬・脱化学肥料化のみならず、農業現場からの温室効果対策という側面ももっていることが期待される。さらに、コンポストの発酵熱を本業であるキノコ生産施設の熱源する例は世界的にも知られていないため、新しいゼロエミッション型キノコ栽培施設としてのモデルケースとして評価されるものと思われる。

最後に、タイトなスケジュールの中でご尽力下さった、各参画研究機関の研究者の皆様、委員会へ精力的にご参加いただいたアドバイザーの皆様、および研究への多大なご協力をいただいた皆様、技術指導を頂戴した皆様へ、この場をお借りし深く感謝申し上げます。ありがとうございました。

1. 好熱菌の培養方法

Niisawa, C., Oka, S., Kodama, H. et al. (2008) Microbial analysis of a composted product of marine animal resources and isolation of bacteria antagonistic to a plant pathogen from the compost J.Gen.Appl.Microbiol. 54: 149-158.

2. 病気と硝酸濃度との関係

2009年現代農業6月号

3. 硝酸と発ガンに関して

Jakszyn, P. and C.A. Gonzalez, (2006) Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer ... World J Gastroenterol, 2006. 12: 4296-4303.

Castanheira I, Oliveira L, Valente A, Alvito P, Costa HS, Alink A. (2004) The need for reference materials when monitoring nitrate intake. Anal Bioanal Chem 378:1232-1238.

2007年4月19日朝日新聞

4. P450norと一酸化二窒素(N₂O)に関して

Shoun, H., & Tanimoto, T. (1991) Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* and involvement of cytochrome P-450 in the respiratory nitrite reduction. J. Biol. Chem. 266, 11078-11082

R. J. Laughlin and R. J. Stevens (2002) Evidence for Fungal Dominance of Denitrification and Codenitrification in a Grassland Soil Soil Sci. Soc. Am. J. 66: 1540 - 1548.

5. リアルタイムPCRに関して

Ritalahti, K.M., Amos, B.K., Sung, Y., Wu, Q., Koenigsberg, S.S., Löfler, F.E. (2006) Quantitative PCR targeting 16S rRNA and reductive dehalogenase genes simultaneously monitors multiple dehalococcoides strains. Appl. Environ. Microbiol. 72: 2765-2774

Borneman, J. and Hartin, R.J. (2000) PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. Appl. Environ. Microbiol. 66: 4356-4360

Koenigsberg, S.S., Löfler, F.E. (2006) Quantitative PCR targeting 16S rRNA and reductive dehalogenase genes simultaneously monitors multiple dehalococcoides strains. Appl. Environ. Microbiol. 72: 2765-2774

Vancov, T. and Keen, B (2009) Amplification of soil fungal community DNA using the ITS86F and ITS4 primers. FEMS Microbiol. Lett. 296: 91-96